ELISA HTLV I/II 3.0

CE
0123

DATA DE REVISÃO: 05/05
MBJ 0011-BRA-0

Observação: alterações realçadas.

REF 21080-096 : (kit de 96 testes)
21080-192 : (kit de 192 testes)
21080-480 : (kit de 480 testes)

NOME E APLICAÇÃO

O TESTE ELISA HTLV I/II da MP DIAGNOSTICS (MPD) é uma prova imunoenzimática para a detecção de anticorpos para HTLV-I e HTLV-II no soro ou plasma humanos. Destina-se a ser usado como prova de triagem, sendo necessária a repetição dos testes das amostras inicialmente reativas.

DESCRIÇÃO DE SÍMBOLOS USADOS

Os símbolos gráficos usados ou encontrados nos produtos e embalagens **MP Diagnostics** estão indicados a seguir. Estes são os símbolos mais comuns em dispositivos médicos e respectivas embalagens; estes símbolos são explicados com mais detalhes no British and European Standard BS EN 980: 2003.

Usar até
Sinônimos:
Data de validade

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Código do lote
Sinônimos:
Número do lote
Número da remessa

Número de catálogo

Limites de temperatura

Atenção. Ver Instruções de Uso

Fabricante

Representante Autorizado na Comunidade Européia

Contém o suficiente para <n> testes

Consulte as instruções de uso

Não reutilize

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos recentes nos Estados Unidos e Europa confirmaram a ocorrência predominantemente mista de HTLV-I e HTLV-II nas diferentes populações de alto risco, como em usuários de drogas intravenosas e receptores de transfusões. Baseando-se na reatividade cruzada dos soros anti-HTLV-I e anti-HTLV-II para o lisado viral, a primeira geração de kits de teste utilizava um lisado viral de HTLV-I; a segunda geração de kits de teste utilizava um lisado viral de HTLV-I acrescido de antígenos recombinantes para os testes de triagem. Contudo, os testes de triagem atualmente disponíveis de primeira e segunda geração, baseados em lisado viral de HTLV-I/II, não têm sensibilidade para determinar a infecção pelo HTLV-II e apresentam alto grau de falsos positivos em soros de indivíduos não infectados.

É necessário um teste HTLV-I/II ELISA que seja altamente sensível e específico para a detecção de anticorpos anti-HTLV-I e anti-HTLV-II.

O teste **ELISA HTLV I/II 3.0 da MP Diagnostics** utiliza unicamente uma combinação de antígenos recombinantes. Este tipo de teste garante a detecção do HTLV-I e do HTLV-II por epítopos específicos.

O teste **ELISA HTLV I/II 3.0 da MP Diagnostics** é um teste imunoenzimático qualitativo para a detecção de anticorpos contra HTLV-I e contra HTLV-II encontrados no soro ou plasma humanos. Destina-se a ser usado como primeira medida de triagem, sendo necessárias a repetição dos testes das amostras inicialmente reativas e a confirmação das amostras repetidamente reativas por provas suplementares como o Western Blot **HTLV BLOT 2.4 MPD.**

PRINCÍPIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO PROCEDIMENTO

Os poços das tiras de poliestireno da microplaca são recobertos com uma mistura de antígenos recombinantes de HTLV-I e HTLV-II que correspondem aos segmentos de alta antigenicidade do HTLV-I e do HTLV-II. As amostras de soro ou plasma humano, diluídas na solução-tampão de diluição, são incubadas nestes poços revestidos. Os anticorpos específicos contra HTLV-I/II, caso presentes, se unirão aos antígenos imobilizados na fase sólida. Os poços são cuidadosamente lavados para retirada de material não ligado, e é adicionado aos poços um anticorpo caprino anti-IgG humana purificado por afinidade e marcado com peroxidase do rábano. Este anticorpo marcado se ligará a todos os complexos antígeno-anticorpo anteriormente formados e o excesso de anticorpos marcados não ligados é removido por lavagem. Uma solução de substrato contendo peróxido de hidrogênio e diidrocloreto de o-fenilenodiamina (OPD.2HCl) é então adicionada a cada poço. A presença de anticorpos específicos é indicada pelo desenvolvimento de coloração amarelo-alaranjada após a adição do substrato. A reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico. A intensidade da cor é medida em espectrofotômetro a 492 nm e é proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra.

COMPONENTES DO KIT

Descrição dos Componentes	Quantidade Fornecida		
MICROPLATE **MICROPLACA HTLV** Doze tiras com oito poços por placa. Cada poço da microplaca contém proteínas recombinantes de HTLV-I e HTLV-II absorvidas. Conservar entre 2 °C e 8 °C.	1 PLACA 96 tests	2 PLACAS 192 tests	5 PLACAS 480 tests
CONTROL – **CONTROLE NÃO REATIVO** Soro Normal humano, não reativo para anti-HCV, anti-HIV-1/2, anti HTLV-I/II e HBsAg. Contém timerosal e azida sódica como conservantes. Conteúdo: 280 µl por frasco Conservar entre 2 °C e 8 °C.	1 frasco	2 frascos	3 frascos
CONTROL + **CONTROLE REATIVO** Soro humano inativado contendo alto título de anticorpos específico para HTLV-I/II e não reativo para anti-HCV, anti-HIV-1/2 e HBsAg Contém timerosal e azida sódica como conservantes. Conteúdo: 300 µl por frasco Conservar entre 2 °C e 8 °C.	1 frasco	2 frascos	4 frascos
DILUENT **DILUENTE** Solução salina com Tris contendo soro caprino normal tratado por calor, soro albumina bovina e estabilizantes. Contém Bronidox™ como conservante. Conteúdo: 100 ml por frasco. Conservar entre 2 °C e 8 °C.	1 frasco	1 frasco	2 frascos
WASH PLATE 20X **CONCENTRADO (20X) PARA LAVAGEM DE PLACAS** Solução-tampão fosfato com Tween-20. Contém cloroacetamida como conservante. Conteúdo: 120 ml por frasco. Conservar entre 2 °C e 8 °C.	1 frasco	1 frasco	2 frascos
CONJUGATE **CONJUGADO** Anticorpo caprino anti-IgG humana marcado com peroxidase de rábano. Conteúdo: 45 µl por frasco Conservar entre 2 °C e 8 °C.	1 frasco	2 frascos	3 frascos
BUF SUBS **SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA SUBSTRATO** Solução-tampão citrato contendo peróxido de hidrogênio. Conservar em local escuro entre 2 °C e 8 °C. Conteúdo: 120 ml por frasco.	1 frasco	1 frasco	1 frasco
SUBS OPD **PASTILHA DE SUBSTRATO** o-fenilenodiamina.2HCl. Conservar entre 2°C e 8°C.	4 pastilhas	8 pastilhas	20 pastilhas
SOLN STOP H_2SO_4 2M **SOLUÇÃO DE INTERRUPÇÃO** Solução de ácido sulfúrico 2M. Conservar em local escuro entre 2 °C e 8 °C. Conteúdo: 30 ml por frasco.	1 frasco	1 frasco	1 frasco
TAMPAS DAS PLACAS Tampas adesivas para uso durante a incubação das microplacas.	4 unidades	8 unidades	20 unidades
MANUAL DE INSTRUÇÕES	1 cópia	1 cópia	1 cópia

** Bronidox™ é marca registrada da Henkel Chemical Co.*

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Para uso exclusivo em diagnóstico *in vitro.*
2. Exclusivamente para uso profissional
3. Solicitamos consultar a documentação dos produtos para informações sobre componentes potencialmente perigosos.

INFORMAÇÕES DE SAÚDE E SEGURANÇA

CUIDADO: Este kit contém material de origem humana. Nenhum método de teste pode oferecer garantia total que os produtos de sangue humano não transmitam infecções.

MANUSEIE AS AMOSTRAS E OS CONTROLES REATIVOS E NÃO REATIVOS COMO AGENTES POTENCIALMENTE INFECCIOSOS. Recomenda-se que os componentes e as amostras do teste sejam manuseados de acordo com as boas práticas de laboratório. O descarte deverá ser realizado de acordo com os procedimentos de segurança vigentes.

O ***Controle Reativo*** e o ***Controle Não Reativo*** contêm timerosal e azida sódica. A azida sódica pode reagir com o cobre e o chumbo usados em alguns sistemas de canalização formando sais explosivos. Embora as quantidades usadas neste kit sejam pequenas, o descarte de materiais contendo azida deve ser feito por lavagem com volumes relativamente altos de água de forma a evitar a formação de azida metálica no sistema de canalização. Segue abaixo, o Risco apropriado (R) e frases de Segurança (S).

R20/21/22	Prejudicial por inalação, em contato com a pele e em caso de ingestão.
R32	Em contato com ácidos, há a liberação de gases tóxicos.
S7-32	Mantenha os frascos bem fechados. Não inalar.
S35	Esse material e seus componentes devem ser mantidos em lugar seguro.
S36	Usar vestuário de laboratório apropriado.
S46	Se ingerido, procurar orientação médica imediatamente e apresentar essa bula.

O ***Diluente*** contém Bronidox e Tris os quais são classificados pela Comunidade Econômica Européia(CEE) por aplicável.Diretrizes como Irritante(Xi). Segue abaixo, o Risco apropriado (R) e frases de Segurança (S).

R36/38 Irritante para os olhos e pele.
S26/28 Em caso de contato com os olhos, lave com água em abundância e procure orientação médica.Depois de contato com a pele, lavar imediatamente com água

O ***Concentrado (20X) para Lavagem de placa*** contém 2% Cloroacetamida o qual é classificado pela Comunidade Econômica Européia (CEE) por aplicável. Diretrizes como Irritante(Xi). Segue abaixo, o Risco apropriado (R) e frases de Segurança(S).

R22-43 Prejudicial se ingerido.Pode causar sensibilidade em contato com a pele.
S22-36/37-45 Não inalar.Usar vestuário apropriado e luvas descartáveis.Em caso de ingestão acidental, procurar imediatamente orientação médica (Apresentar a bula se possível).

A ***Solução de Interrupção (Stop Solution)*** é 2M Ácido Sulfúrico, o qual é classificado pela Comunidade Econômica Européia (CEE) por aplicável. Diretrizes como corrosivo (C). Segue abaixo, o Risco apropriado (R) e frases de Segurança (S).

R35 Causa queimaduras grave.
S26-30-45 Caso entre em contato com os olhos,lave imediatamente com água em abundância e procure orientação médica. Nunca adicione água a este produto. Em caso de acidente ou se sentir mal em contato com os componentes, procure imediatamente orientação médica. (Apresentar a bula se possível).

A ***Pastilha de Substrato*** contém o-fenilenodiamina , o qual é classificado pela Comunidade econômica Européia (CEE) por aplicável. Diretrizes como tóxico (T) e perigoso para o ambiente (N). Segue abaixo, o Risco aproriado (R) e frases de Segurança (S).

R20/21-25 Prejudicial se inalado, e em contato com a pele. Tóxico se ingerido.
R36-40-43 Irritatante para os olhos. Evidência limitada de um efeito carcinógeno. Pode causar sensibilização em contato com a pele.
R50/53-68 Muito tóxico a organismos aquáticos.,pode causar efeitos adversos a longo prazo em ambiente aquático. Possíveis riscos de efeitos irreversíveis.
S28-36/37 Após contato com a pele, lave imediatamente com água em abundância e procure orientação médica. Usar vestuário de laboratório apropriado e luvas descartáveis.
S45-60-61 Em caso de acidente ou se sentir mal em contato com os componentes, procure imediatamente orientação médica.(Exibir a bula se possível). Esse material e seus componentes devem ser descartados como material de risco de contaminação. Evite liberação no meio ambiente. Refere-se as instruções especiais / Folhas de dados de segurança.

1. Evite a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar alíquotas dos frascos originais.
2. Não pipete com a boca.
3. Manuseie as amostras, as microplacas, os controles reativos e os controles não reativos como agentes potencialmente infecciosos.
4. Use vestuário de laboratório e luvas descartáveis durante a realização do teste. Descarte as luvas em sacos plásticos para descarte de lixo biológico perigoso. A seguir, lave bem as mãos.
5. É altamente recomendável que este teste seja realizado em uma câmara adequada para material biológico perigoso.
6. Mantenha todo o material longe de alimentos e bebidas.
7. Em caso de acidente ou contato com os olhos, lave imediatamente com água em abundância e procure ajuda médica.
8. Consulte imediatamente um médico caso sejam ingeridos materiais contaminados ou haja contato destes com feridas abertas, ou outras soluções de continuidade da pele.
9. O ácido sulfúrico causa queimaduras graves e a OPD é um irritante. **EVITE CONTATO COM ESTES DOIS REAGENTES.** Caso estes reagentes entrem em contato com a pele, lave com água em abundância.
10. Evite o contato de OPD e de ácido sulfúrico com qualquer agente oxidante ou metal.
11. Não exponha a pastilha e a solução-tampão do substrato à luz forte. Use pinças não metálicas para manusear a pastilha de OPD.
12. Nunca adicione água à Solução de Interrupção.
13. Limpe imediatamente derramamentos de materiais infecciosos com papel absorvente e esfregue imediatamente a área contaminada com solução de hipoclorito de sódio a 1 % antes de continuar o trabalho. O hipoclorito de sódio não deve ser usado em derramamentos que contenham ácidos, a menos que a área seja primeiro enxugada com papel absorvente. O material usado (também as luvas descartáveis) deve ser descartado como material biológico potencialmente perigoso. Não esterilize em autoclave material que contenha hipoclorito de sódio.
14. Antes do descarte, esterilize em autoclave todo o material usado e contaminado a 121 °C, 15 psi durante 30 minutos. Alternativamente, descontamine o material em solução de hipoclorito de sódio a 5 % durante 30 a 60 minutos antes de descartar em sacos para lixo biológico perigoso.
15. Descontamine todos os produtos químicos e reagentes usados adicionando um volume suficiente de hipoclorito de sódio de forma a obter uma concentração final de pelo menos 1 %. Deixe agir durante 30 minutos para garantir uma descontaminação eficiente.

PRECAUÇÕES ANALÍTICAS

1. Amostras de soro ou plasma coletadas em EDTA, heparina ou citrato de sódio, podem ser utilizadas. Antes de armazenar, assegurar que as amostras de soro foram separadas por centrifugação.
2. Para garantir um desempenho perfeito do teste é necessário **SEGUIR À RISCA** os procedimentos descritos neste Manual de Instruções. A inobservância destes procedimentos pode acarretar resultados anômalos.
3. **NÃO MODIFIQUE NEM SUBSTITUA REAGENTES DE UM LOTE DO KIT POR OUTRO.** Os controles, o conjugado e as microplacas são combinados entre si para oferecer um desempenho perfeito. Use somente reagentes fornecidos com o kit.
4. Não use componentes do kit após a data de validade impressa na caixa do kit.

5. Evite a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar alíquotas dos frascos originais. A contaminação reduz prematuramente a vida útil dos kits e fornece resultados errôneos. Use técnicas assépticas incluindo pipetas ou ponteiras de pipetas descartáveis para retirar alíquotas dos frascos.
6. Para evitar a contaminação cruzada, use uma ponteira de pipeta nova para cada amostra aliquotada; não toque no topo ou no fundo das tiras, na borda dos poços ou no líquido dos poços com os dedos ou com as ponteiras das pipetas.
7. Recomenda-se que a vidraria a ser usada com os reagentes seja lavada com ácido clorídrico 2M e enxaguada abundantemente com água destilada ou deionizada antes do uso.
8. Para obter os melhores resultados, deixe que todos os reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente (25 °C ± 3 °C) antes do uso. Imediatamente após o uso, volte a armazenar entre 2 °C e 8 °C.
9. Use somente água de qualidade grau reagente, deionizada ou destilada, para diluir os reagentes.
10. Todos os reagentes devem ser bem misturados antes do uso.
11. A solução de Conjugado de Trabalho, a Solução Tampão de Substrato e a Solução- Tampão de Lavagem Diluída devem ser **preparadas logo antes do uso.**
12. Não exponha os reagentes, nem realize testes em áreas contendo altos níveis de vapores de desinfetantes químicos (e.g., vapores de hipoclorito) durante as etapas de armazenamento ou de incubação. O contato inibe a reação colorida. Da mesma forma, não exponha os reagentes à luz intensa.
13. Não retire as microplacas das bolsas de alumínio até imediatamente antes do uso. As tiras abertas, não usadas, devem ser conservadas entre 2 °C e 8 °C nas respectivas bolsas de armazenamento com o dessecante fornecido.
14. Em cada processamento de amostras de pacientes deve-se testar os controles do kit em paralelo.
15. Deve tomar-se o cuidado de não tocar ou respingar a borda do poço com conjugado. Não sopre na micropipeta. Recomenda-se usar pipetagem reversa sempre que possível.
16. A utilização de amostras muito hemolisadas, soros com coagulação incompleta, amostras de plasma contendo fibrina ou amostras com contaminação microbiana pode fornecer resultados errôneos.
17. **NÃO USE BANHO-MARIA PARA INCUBAR AS PLACAS.**
18. Não use incubadoras de CO_2
19. Durante a incubação a 37 °C, deve-se evitar a evaporação. Cubra as placas com as tampas adesivas fornecidas.
20. Evite abrir e fechar repetidamente a porta da incubadora durante as etapas de incubação.
21. Não mantenha a solução de interrupção em recipiente raso nem a retorne ao frasco após o uso.
22. Verifique se o fundo da placa está limpo e seco e se não há bolhas na superfície do líquido antes de iniciar a leitura da placa. Remova todas as bolhas da placa, e.g. por pancadas leves.
23. Se usar equipamento automático, confira se está aferido antes do uso.
24. É altamente recomendável fazer a manutenção de rotina do sistema de aspiração e lavagem para evitar contaminação por passagem de amostras muito reativas para amostras não reativas.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

1. Conserve o kit ELISA HTLV I/II 3.0 da MPD e seus componentes entre 2 °C e 8 °C quando não estiver sendo usado.
2. Todos os reagentes e tiras de microplacas do teste quando conservados entre 2 °C e 8 °C, permanecem estáveis até à data de validade fornecida no kit. Não congele os reagentes.
3. Pode ocorrer formação de precipitado quando o Diluente é conservado entre 2 °C e 8 °C. Isto não afetará o desempenho do kit.
4. Quando o Concentrado (20x) para Lavagem de Placas (20x) é mantido entre 2 °C e 8 °C pode ocorrer formação de cristais. Estes deverão ser dissolvidos por aquecimento a 37 °C antes do uso.
5. As tiras de microplacas abertas e não usadas, devem ser mantidas em bolsa fechada, com o dessecante fornecido, entre 2 °C e 8 °C.

COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Amostras de soro ou plasma coletadas em EDTA, heparina ou citrate de sódio podem ser utilizadas. Antes de armazenar, assegurar que as amostras de soro foram separadas por centrifugação.

As amostras devem ser conservadas entre 2 °C a 8 °C se o teste for realizado dentro de sete dias após a coleta, ou congelados a -20 °C se for previsto que o teste será realizado em mais de 7 dias após coleta. As amostras límpidas, não hemolisadas, são preferíveis. Amostras lipêmicas, ictéricas ou contaminadas (partículas) devem ser filtradas (0,45 µm) ou centrifugadas antes do teste.

Os soros dos pacientes podem ser inativados, mas esta não é uma exigência para o perfeito desempenho do teste.
Inative da seguinte forma:

1. Afrouxe as tampas dos recipientes de soro.
2. Aqueça o soro a 56 °C durante 30 minutos em banho-maria.
3. Deixe o soro esfriar antes de apertar novamente as tampas.
4. O soro pode ser mantido congelado até a análise.

Recomendamos que os soros dos pacientes não sejam submetidos á vários ciclos de congelamento e descongelamento.

MATERIAL ADICIONAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

1. Papel absorvente para forrar bancadas e toalhas de papel.
2. Tubos ou recipientes de polipropileno.
3. Pipetas graduadas: 5 ml, 10 ml.
4. Pipetador multicanal capaz de distribuir 50 µl, 100 µl, e 200 µl.
5. Pipetador capaz de distribuir 1-1000 µl.
6. Ponteiras de pipetas descartáveis
7. Recipientes (cubas) de reagentes com capacidade para 25 ml.
8. Água deionizada ou destilada, qualidade reagente.
9. Frascos: 500 ml, 1 litro.
10. Lavadora de microplaca ELISA. Alternativamente, a lavagem pode ser realizada manualmente usando um pipetador multicanal dispensando 0.3 ml do volume e um aspirador
11. Uma incubadora a 37 ± 1°C.
12. Um leitor de microplacas de comprimento de onda duplo (A_{492}-A_{620}) ou simples (A_{492})
13. Solução de hipoclorito de sódio (5 %) ou água sanitária para uso doméstico.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

1. CONJUGADO DE TRABALHO

a. O CONJUGADO DE TRABALHO deve ser **preparado logo antes do uso.**

b. Para preparar o conjugado diluído, dilua o conjugado a 1:500 com o diluente fornecido no kit; por exemplo, 20 µl de conjugado para 10 ml de diluente.

c. Use exclusivamente recipientes ou tubos de polipropileno.

PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DE CONJUGADO		
Número de testes	Vol. de Conjugado (µl)	Vol. de diluente (ml)
24	10,0	5,0
48	15,0	7,5
72	20,0	10,0
96	24,0	12,0

2. SOLUÇÃO DE TRABALHO DE SUBSTRATO

a. Prepare a SOLUÇÃO DE TRABALHO DE SUBSTRATO pelo menos 15 minutos antes do uso. Uma vez preparada, a solução permanecerá estável durante 60 minutos à temperatura ambiente.

b. Transfira o volume necessário de SOLUÇÃO- TAMPÃO PARA SUBSTRATO para um recipiente adequado usando uma pipeta limpa.

c. Transfira as pastilhas de OPD para a SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA SUBSTRATO usando uma pinça não metálica.

d. Dissolva uma pastilha para cada 5 ml da SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA SUBSTRATO. Misture bem. Antes de usar, verifique se a dissolução foi completa. **Proteja da luz.**

A SOLUÇÃO DE TRABALHO DE SUBSTRATO deve ser incolor ou de tom amarelo pálido para desempenho adequado do teste. Qualquer outra cor pode indicar deterioração da solução-tampão ou das pastilhas de substrato ou sujeira no recipiente.

PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO		
Número de testes	Pastilhas	Solução-tampão para substrato (ml)
24	1	5,0
48	2	10,0
72	2	10,0
96	3	15,0

3. SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA

a. A SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA deve ser **preparada logo antes do uso.**

b. Dilua um volume de CONCENTRADO PARA LAVAGEM DE PLACAS com 19 volumes de água destilada (qualidade reagente). Misture bem. Para lavar uma placa são necessários aproximadamente 400 ml de solução-tampão para lavagem de placas.

PROCEDIMENTO DO TESTE

IMPORTANTE: Os imunoensaios desta natureza são sensíveis à temperatura e dependentes do tempo. É necessário seguir à risca os procedimentos do teste para garantir um desempenho perfeito. Alterações em relação ao procedimento recomendado podem acarretar resultados anômalos.

1.	Remova a microplaca da bolsa de alumínio.	
2.	Agite os frascos de amostras e de controle antes do uso.	
3.	Preencha um recipiente de reagente com **DILUENTE.** Usando um pipetador multicanal, adicione 200 µl de **DILUENTE** em todos os poços.	200 µl
4.	Os poços A1 e B1 são **'BRANCOS' -NÃO ADICIONE AMOSTRAS A ESTES POÇOS.** Acrescente 20 µl adicionais de diluente a estes poços.	20 µl
5.	Acrescente 20 µl de amostra ao poço designado, começando pelo poço H1. Isto resultará em uma concentração final da amostra de 1: 11. **NÃO COLOQUE AMOSTRA EM UM POÇO VAZIO.**	20 µl
6.	Após adicionar a amostra a ser analisada, acrescente 20 µl/poço de **CONTROLE NÃO REATIVO** aos poços C1 e D1.	20 µl
7.	Adicione 20 µl de **CONTROLE REATIVO** por poço aos poços E1, F1 e G1. Misture bem batendo levemente em todos os lados da microplaca, tendo o cuidado de manter a placa plana sobre a bancada.	20 µl
8.	Para evitar evaporação durante a incubação, cubra cuidadosamente a microplaca com uma tampa de placa fornecida .	
9.	**Incube durante 60 minutos a 37 °C (não utilize banho-maria a 37 °C para a incubação).**	60 minutos
10.	Antes de lavar a microplaca, prepare o **CONJUGADO DE TRABALHO** conforme descrito em **PREPARAÇÃO DE REAGENTES.**	
11.	Remova e descarte a tampa da placa; lave então a microplaca com **SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA** usando um dos dois métodos recomendados.	
A.	Lavadora Automática ou Semi-Automática de Microplacas - Lave seis (6) vezes com pelo menos 300 µl por poço e por lavagem.	300 µl por poço e por lavagem
B.	Lavadora Manual de Microplacas - Aspire completamente o conteúdo de todos os poços, levando suavemente a ponta do aspirador até o fundo de cada poço. **CUIDADO PARA NÃO ARRANHAR A SUPERFÍCIE INTERNA DO POÇO.** Preencha toda a placa com pelo menos 300 µl/poço, e depois aspire imediatamente na mesma ordem. Execute este ciclo seis (6) vezes.	300 µl por poço

12. Seque completamente invertendo a microplaca sobre papel absorvente e dando batidas firmes na placa. Toda a solução-tampão de lavagem residual da placa deve ser totalmente eliminada. Se houver resíduos de solução-tampão de lavagem na placa, poderá ocorrer inibição de desenvolvimento de cor durante a incubação do substrato.

13. Preencha um recipiente de reagente com **CONJUGADO DE TRABALHO.** Usando um pipetador multicanal, adicione 100 µl de **CONJUGADO DE TRABALHO** a cada poço. Coloque outra tampa de placa. — 100 µl

14. **Incube a microplaca durante 30 minutos a 37 °C (não utilize banho-maria a 37 °C para a incubação).** — 30 minutos

15. Prepare a **SOLUÇÃO DE TRABALHO DE SUBSTRATO** conforme as instruções de **PREPARAÇÃO DE REAGENTES.** Proteja a solução de substrato da luz. O excesso de solução deve ser descartado após o uso.

16. Remova e descarte a tampa da placa. Repita o procedimento de lavagem como nas etapas 11 e 12.

17. Preencha um recipiente de reagente com **SOLUÇÃO DE TRABALHO DE SUBSTRATO.** Usando um pipetador multicanal, adicione 100 µl de **SOLUÇÃO DE TRABALHO DE SUBSTRATO** a cada poço. Coloque uma tampa de placa. — 100 µl

18. Incube durante 15 minutos em local escuro a 37 °C. **(Não utilize banho-maria a 37 °C para a incubação).** — 15 minutos

19. Remova e descarte a tampa da placa.

20. Usando um pipetador multicanal, adicione 50 µl de **SOLUÇÃO DE INTERRUPÇÃO** a cada poço. Misture suavemente batendo na placa. — 50 µl

21. Determine a absorbância de cada poço a 492 nm. Caso seja usado um instrumento de filtro duplo, o comprimento de onda de referência deve ser de 620 nm.

NOTA: A absorbância deve ser lida no prazo de uma hora após a adição da SOLUÇÃO DE INTERRUPÇÃO

CONTROLE DE QUALIDADE

1. Em todas as placas de todos os processamentos de amostras, deve-se testar o BRANCO e o CONTROLE NÃO-REATIVO em duplicata e o CONTROLE REATIVO em triplicata.

2. Os valores do Branco devem ter absorbância de $\leq$ 0.100.

3. Os valores de absorbância do Controle Não Reativo devem ser iguais a 0,000 e $\leq$ que 0,100 depois de subtraído o valor do Branco.

4. Pelo menos 2 dos 3 valores dos Controles Reativos devem ter absorbância $\geq$ 0.800 depois da subtraído o Branco. Quaisquer valores fora desta faixa não devem ser usados para o cálculo da Média do Controle Reativo ($RC\bar{x}$).

5. Caso 2 ou mais valores de Controle Reativo se desviarem em mais de 30 % da MÉDIA, o processamento é considerado INVÁLIDO e deve ser repetido.

6. Para que o teste seja válido, a diferença entre as absorbâncias médias do Controle Reativo e do Controle Não Reativo ($RC\bar{x}$ - $NRC\bar{x}$) deve ser igual a 0,700. Caso contrário, a técnica pode ser colocada sob suspeita e o teste deverá ser repetido. Caso esta diferença MÉDIA de absorbância ($RC\bar{x}$ - $NRC\bar{x}$) seja sempre baixa, pode ter ocorrido deterioração dos reagentes.

RESULTADOS

Cada microplaca deve ser considerada em separado para o cálculo e a interpretação dos resultados do teste, independentemente do número de placas processadas.

OS VALORES MÉDIOS DE ABSORBÂNCIA DO BRANCO DEVEM SER SUBTRAÍDOS DE TODOS OS VALORES DE ABSORBÂNCIA DA PLACA ANTES DA INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.

A presença ou ausência de anticorpos específicos para HTLV I/II é determinada comparando a absorbância das amostras com o VALOR LIMITE (*Cut-off value* - COV) da placa.

O VALOR LIMITE é calculado como (0,45 unidades de absorbância + Absorbância Média do Controle Não Reativo):

VALOR LIMITE = 0,45 + $NRC\bar{x}$

CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Cálculo da Absorbância Média do Controle Não Reativo ($NRC\bar{x}$)

Exemplo:	Poço Nº	Absorbância
	C1	0,020
	D1.	0,022
	Total	0,042
	Média	0,042 / 2 = 0,021 ($NRC\bar{x}$)

Os valor Individual do Controle Não-Reativo deve ser $\leq$ 0.100 unidade.

Caso um valor do Controle Não Reativo não satisfaça algum dos critérios anteriores, o teste será considerado inválido e deverá ser repetido.

2. Cálculo da Absorbância Média do Controle Reativo (RC$\bar{x}$)

Exemplo:	Poço Nº	Absorbância
	E1	1,221
	F1	1,144
	G1	1,298
	Total	3,663
	Média	3,663 / 3 = 1,221 (RC$\bar{x}$)

O valor do Controle Reativo deve ser igual a 0,800 e.

Caso um valor do Controle Reativo não satisfaça algum dos critérios anteriores, deve ser excluído como anormal. A média do Controle Reativo (RC$\bar{x}$) deve ser então recalculada usando-se os valores restantes de Controle Reativo. Todos os restantes valores de Controle Reativo devem satisfazer os critérios anteriores ou o teste será considerado inválido e deverá ser repetido.

3. Cálculo da diferença entre RC$\bar{x}$ e NRC$\bar{x}$.

Exemplo:	NRC$\bar{x}$	= 0,021
	RC$\bar{x}$	= 1,221
	RC$\bar{x}$ - NRC$\bar{x}$	= 1,221 - 0,021
		= 1,200

Para que o teste seja válido, o valor de RC$\bar{x}$ deve ser igual a 0,700. Caso contrário, deve-se suspeitar que a técnica tenha sido incorreta ou que houve deterioração de reagentes e o teste deverá ser repetido.

4. Cálculo do VALOR LIMITE

	Valor LIMITE	= 0,450 + NRC$\bar{x}$
Exemplo:	NRC$\bar{x}$	= 0,021
	Valor LIMITE	= 0,450 + 0,021
		= 0,471

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. Amostras com valores de absorbância menores que o valor LIMITE são consideradas **Não Reativas** pelo ELISA HTLV I/II 3.0 MPD .
2. Amostras com valores de absorbância maior ou igual ao valor LIMITE CUT - OFF são consideradas **inicialmente reativas** pelos critérios do ELISA HTLV I/II 3.0 MPD e devem ser analisadas uma segunda vez em duplicata antes da interpretação.
3. Amostras Reativas em um segundo teste podem ser interpretadas como **repetidamente reativas** para anticorpos contra HTLV-I/II pelos critérios do ELISA HTLV I/II 3.0 MPD .
4. Amostras inicialmente reativas e que se comportam como **Não Reativas** quando analisadas pela segunda vez são consideradas **negativas** pelos critérios do ELISA HTLV I/II 3.0 MPD .
5. Amostras repetidamente reativas no ELISA HTLV I/II 3.0 MPD devem ser analisadas por testes adicionais, mais específicos, como o HTLV BLOT 2.4 MPD .

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

O desempenho do ELISA HTLV I/II 3.0 MPD para a detecção de anticorpos para HTLV-I e HTLV-II foi avaliado usando HTLV-I/II soropositivo e amostras negativas.

Sensibilidade
420 amostras reativas (ELISA e/ou Western Blot positivas) foram estudadas e avaliadas separadamente e conduzidas em três locais diferentes: no local de trabalho, Suécia e Austrália. Na Suécia (n=163) o estudo indica sensibilidade comparável ao sistema de comparações.Ao passo que, na Austrália (n=155) a avaliação apresentou sensibilidade de 100%, no local de trabalho, uma avaliação de sensibilidade de 99% (105/106) baseado em amostras comerciais e Títulos Misturados do painél PRP206. Uma única amostra apresentou resultado negativo com ELISA HTLV I/II 3.0 MPD no local de trabalho .A avaliação também apresentou um resultado negativo com um outro teste ELISA de fabricante de qualidade e apresentou o resultado como indeterminado no Western Blot, com a presença fraca das bandas GD21 e p19 .

As três avaliações indicaram uma sensibilidade superior a 99.7%.

Especificidade
Um total de 5300 amostras abrangendo amostras de soros de doadores casuais (5,000), amostras clínicas (200) ,amostras potencialmente interferidas (100) foram testadas. Diagnostico específico em doadores de sangue casuais, amostras clínicas e amostras potencialmente interferidas, grupos foram encontrados sendo 99.8%, 98% and 97% respectivamente. ELISA HTLV I/II 3.0 MPD apresentou alta especificidade, maior que 99% para todos os três sets de amostras testados.

Reprodutibilidade
O inter-lote e intra-lote reprodutibilidade do ELISA HTLV I/II 3.0 MPD foi avaliado no local de trabalho usando kits controle, HTLV-I amostras positivas, HTLV-II amostras negativas e ACCURUN 24, um multi-marcador Confirmatório Controle da BBI.

Inter-Lote: Dois lotes de microplacas foram testados em quarto ocasiões diferentes com 3 duplicatas de cada kit controle, e 8 duplicatas das amostras restantes em cada ocasião.

Intra-Lote: Um lote de microplaca foi testado duas vezes em um dia com 8 duplicatas de cada amostra incluindo os kits controles para cada teste corrido em quatro dias separados.

Os resultados indicaram que o Coeficiente de Variação (CV) estava entre 3 - 8 % para as amostras testadas.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Resultados repetidamente positivos do ELISA HTLV I/II 3.0 MPD constituem indicações da presença de anticorpos para HTLV-I/II na amostra. Um resultado **NÃO-REATIVO** do ELISA HTLV I/II 3.0 MPD indica provável ausência de anticorpos detectáveis para HTLV-I/II na amostra. Contudo, não existem dados suficientes que permitam excluir a transmissão do HTLV-I/II em amostras de sangue definidas como não reativas pelo ELISA HTLV I/II 3.0 MPD. Um resultado **NEGATIVO** não exclui a possibilidade de exposição a ou de infecção pelo HTLV-I/II.

Pode-se suspeitar de resultados falsos reativos com um kit para testes desta natureza. A proporção de falsos reativos dependerá da sensibilidade e da especificidade do kit de teste. Para a maioria dos testes de triagem, quanto mais elevada a prevalência de anticorpos contra HTLV-I/II na população, menor será a proporção de amostras falsas reativas.

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE EXPLÍCITA E LIMITADA

O fabricante não oferece nenhuma outra garantia expressa senão a de que o kit de teste funcionará como um ensaio de diagnóstico *in vitro* dentro das especificações e limitações descritas no Manual de Instruções do produto, quando usado em conformidade com as instruções nele contidas. O fabricante isenta-se de qualquer responsabilidade, expressa ou implícita, incluindo as garantias expressas ou implícitas em relação à capacidade de comercialização, de utilização ou utilidade implícita para quaisquer outros fins. A responsabilidade do fabricante limita-se à substituição do produto, ou ao reembolso do preço de compra do produto. O fabricante não será considerado responsável pelo comprador ou por terceiros, por quaisquer danos, prejuízos ou perdas de caráter econômico causados pelo uso ou aplicação do produto.

PROBLEMAS TÉCNICOS E QUEIXAS

Caso haja algum problema técnico ou queixa, solicitamos proceder da seguinte forma:

1. Anote o número de lote do kit e a data de validade.
2. Conserve o kit e os resultados obtidos.
3. Contate o escritório MP Biomedicals mais próximo ou o seu distribuidor local.

REFERÊNCIAS

1. Poisez B.J. et al., Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77:7145-7419.

2. Kalyanaraman V.S., et al., A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 1982; 218:571-573.

3. Williams A.E. et al., Seroprevalence and epidemiological correlates of HTLV-I infection in U.S. blood donors. Science 1988; 240:643-646.

4. Lipka J.J., et. al., 1990. Enhancing the sensitivity of HTLV-I immunoassays in Human Retrovirology : HTLV, Edt W.A. Blattner, Raven Press (NY). pp 409-475.

5. Lee H. et. al., High rate of HTLV-II infection in seropositive IV drug abusers in New Orleans. Science 1989; 244:471-475.

6. Lipka J.J. et. al., Modified Western Blot Assay for confirmation and differentiation of Human T-cell Lymphotropic Virus Type-I and II. J. Infect Dis. 1991; 164:400-403.

7. Lipka J.J. et. al., Segregation of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I and II infections by Antibody Reactivity to Unique Viral Epitopes.J. Infect. Dis. 1992; 165:268-272.

8. Hadlock K.G., Goh C.J., Bradshaw P.A.,Perkins S., Lo J., Habbas R.K., Kaplan l., and Foung S.K.H. Delineation of an Immunodominant and highly HTLV specific epitope within the HTLV-I transmembrane glycoprotein. Blood 1995; 68 (4):392-1399.

9. Varma M., Rudolph D., Knuchel M., Switzer W., Hadlock K.G., Velligan M., Chan l., Foung S.K.H., and Lal R.B., Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of HTLV-I and HTLV-II infection by Western Blot assay containing recombinant envelope glycoproteins.J.Clin.Micro,1995; 33(12):3239-3244.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Cingapura 118259
Tel N°. : + 65 6775 0008
Fax N°. : + 65 6775 4536
E-mail : enquiry_ap@mpbio.com

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St.Ingbert
Alemanha
Tel. : + 49 68 94 58 1020
Fax. : + 49 68 94 58 1021
Email : info@mt-procons.com

Escritórios Regionais:

MP Biomedicals Suisse S.A.
Halle de Fret/Aeroport
P.O. Box 1015
1211 Genebra 5
Suíça
Tel N°. : (4122) 788-1908
Fax N°. : (4122) 788-1986
E-mail: mpbiosuisse@mpbio.com

* Patente Austrália	613350, 667189, 690540
* Patente EUA	5,066,579, 5,614,366 5,763,572, 5,814,441 5,871,933, 5,643,714
* Patente Canadá	1337799
* Patente Europa	0395634
* atente Japão	2559482